

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Матиева Антона Богдановича на тему: «Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с α -синуклеином», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика

Диссертация Антона Богдановича Матиева, выполненная на кафедре Генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета под руководством Станислава Александровича Бондарева, посвящена изучению амилоидогенных свойств белка NOS1AP и его потенциал к коагрегации с α -синуклеином. Актуальность выбранной темы во многом определяется социальным значением амилоидных заболеваний, включая болезнь Паркинсона, а также возможную роль вовлечения в агрегаты адаптерного белка синтазы оксида азота 1 в развитии различных нарушений психики, в том числе шизофрении.

Выполненное А.Б.Матиевым исследование расширяет представления об этиологии и молекулярных механизмах развития упомянутых выше заболеваний. Автором исследования впервые показана способность белка NOS1AP при сверхпродукции в клетках дрожжей и человека изменять конформацию с образованием агрегатов, характеризующихся биохимическими характеристиками амилоидов и демонстрирующих цитотоксичность в клетках млекопитающих. Получены свидетельства физического взаимодействия адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и α -синуклеина в исследованных модельных системах, а также определён участок белка NOS1AP, способствующий ускорению образования фибрилл α -синуклеина. Эти результаты, помимо очевидного значения в развитии фундаментальных представлений о роли конформационных изменений белков в реализации физиологических процессов на клеточном уровне, могут найти практическое применение при разработке комплексных терапевтических подходов, в том числе для лечения некоторых психологических расстройств.

Текст диссертации построен по традиционному плану, изложен на 129 страницах и содержит все необходимые разделы, включая четыре главы основного текста. «Введение» содержит полную характеристику работы, а также в ней обосновывается актуальность изучаемой проблемы, формулируются цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту. Каждая глава основного текста диссертации хорошо структурирована и содержит подразделы нескольких порядков, что облегчает знакомство с материалом. Глава «Обзор литературы» достаточно объемная и занимает около трети всей работы. Это позволило автору достаточно широко раскрыть тему и демонстрирует достаточно глубокое владение материалом, однако при описании гистологических характеристик амилоидозов автор испытывает неуверенность, часто дословно переводя текст из англоязычных источников, а не применяя устоявшиеся в русскоязычной научной литературе описания. Попытка включить в текст работы описания всех известных на сегодня случаев конформационных переходов белков с характеристикой их роли в физиологических процессах или развитии патологии привела к тому, что местами автор переходит к использованию практически телеграфного стиля, а собственно тематике исследования уделено не очень много места. В коротком заключении к этой главе автор

подчеркивает актуальность тематики исследования с акцентом на роли взаимодействия адаптерного белка синтазы оксида азота 1 с α -синуклеином.

Глава «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание материалов, включающее штаммы, клеточные линии, а также различные генно-инженерные конструкции, однако стиль изложения часто граничит с лабораторным жаргоном. К недостаткам оформления также можно отнести способ представления плазмид в таблице 1, а именно перечисление в столбце «Маркер» генов устойчивости к антибиотику для бактериальных плазмид, однако для челночных векторов в том же столбике автор указал гены, компенсирующие проторофность у дрожжевых клеток, при этом бактериальный селективный маркер для них вообще не указан. Список использованных в работе методов очень внушительный, однако и тут стиль изложения порой оставляет впечатление недосказанности, чрезмерной конспективности. Некоторые методы описаны несколькими общими фразами, с отсылкой к базовым протоколам без конкретизации. К примеру, так и осталось непонятным что именно автор имеет ввиду, упоминая стандартную процедуру приготовления компетентных клеток из штаммов TOP10 и XL10-Gold и чем она отличается от приготовления химических компетентных клеток с использованием хлорида кальция, которая использовалась для остальных бактериальных штаммов (стр. 49). Удивило также использование для различных пар праймеров одного протокола ПЦР с фиксированной «подобранной экспериментально» температурой отжига 55°C (таблицы 4 и 5, стр. 50-51), либо 63°C (таблицы 6 и 7, стр. 51-52). На фоне конспективного изложения протоколов положительно выделяется описание только одного метода «Анализ кинетики агрегации белков», в связи с этим осталось непонятным, почему описанию остальных методов уделено так мало внимания.

В третьей главе описаны основные результаты экспериментальной части исследования, которая начинается с описания биоинформатического анализа, дополняющего выполненные ранее исследования, описанные в первой главе. Полученные результаты позволили уточнить положение потенциально амилоидогенных районов белка NOS1AP, в связи с чем осталась непонятной мотивация разделить белок на три участка для более детального индивидуального исследования, тогда как, согласно представленным на рисунке 10 данным, все использованные алгоритмы в середине участка 1-291 предсказывают расположение полипептидного района, потенциально способного к агрегации, тогда как большая часть этого фрагмента (соответствующая карбоксипептидазе E) не демонстрирует такого потенциала. Почему этот участок был исследован целиком, а не разделен хотя бы на 2 субучастка?

К представленным далее результатам характеристики отдельных участков в генно-инженерных моделях также есть вопросы. Если неудачи с характеристикой амилоидных свойств агрегатов в бактериальных клетках на основе связывания красителей можно принять в интерпретации автора, то результаты изучения агрегатов в дрожжевых системах нельзя интерпретировать однозначно, т.к. представленный рисунок 14 не содержит информации об исследовании всех вариантов. Кроме того, непонятно чем объясняются существенные различия результатов, полученных в дрожжевых системах и на культурах клеток млекопитающих. Не может ли это быть следствием из индивидуальной существенной разницы в количестве белка, несущего разные участки белка NOS1AP, который мы видим на рисунке 18А. Чем вызваны такие количественные различия и не

могут ли они и быть основной причиной отсутствия олигомеров при сверхпродукции белков, несущих участки 292-390 и 391-506 в этом эксперименте? Ответ на этот вопрос мог бы дать результат оценки выживаемости клеток при сверхпродукции различных вариантов, однако на рисунке 19 мы видим данные только о влиянии α -синуклеина и полноразмерного адаптерного белка синтазы оксида азота 1. Непонятно, чем обусловлено такое сокращение числа исследованных вариантов, тогда как следующий раздел работы свидетельствует о том, что все варианты клеточных линий были получены и исследованы на предмет коагрегации с α -синуклеином (рисунок 20).

Для изучения коагрегации различных участков белка NOS1AP с α -синуклеином в дрожжевой системе автором создана целая серия генно-инженерных конструкций на основе челночных векторов с применением пары флуоресцирующих белков, спектр которых позволяет провести полноценные количественные измерения коагрегации методом FRET, однако автор исследования почему-то ограничивается только микрофотографиями (рисунки 21 и 22) и не приводит результаты точных измерений. Это существенно снижает уровень достоверности полученного результата. Было бы важным увидеть эти данные в ходе процедуры защиты диссертации, т.к. все штаммы автором получены в ходе работы и такие данные должны быть.

Биохимические исследования по коагрегации α -синуклеина с различными участками адаптерного белка синтазы оксида азота 1 демонстрируют высокую квалификацию автора и уверенное владение использованными методами, однако осталось непонятным почему в этих экспериментах исключен фрагмент NOS1AP (1-291), было бы интересно увидеть особенности взаимодействия этого участка или его отсутствие в сравнении с исследованными участками.

В главе «Обсуждение» автор предлагает оригинальную гипотезу роли агрегации NOS1AP в развитии патологических процессов, которые могут приводить как к манифестации болезни Паркинсона, так и к шизофрении. Эта гипотеза проиллюстрирована авторскими схемами, однако в них не уточняется роль локализации той или иной агрегации на клеточном и тканевом уровнях. Возможно, гистологические исследования в будущем могут позволить уточнить реальный патогенез и выбор направления развития заболевания.

Текст диссертации аккуратно отформатирован, практически не содержит опечаток, всего в работе 36 рисунков и 8 таблиц. Список цитированной литературы включает 373 источника, включая одну свою работу, однако непонятно, по какой причине автор проигнорировал русскоязычные публикации, причем не только методические работы и публикации своего руководителя, но и собственную публикацию.

Дополнительно текст содержит разделы «Список сокращений» и «Благодарности», что предусмотрено ГОСТ к оформлению диссертаций на соискание научных степеней. Структура и оформление текста диссертации в целом соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, однако к недостаткам следует отнести включение в нумерацию глав основного текста таких разделов как «Выводы» и «Список цитированной литературы», которым присвоено значение глав 5 и 6, соответственно.

Поставленная в работе цель и конкретные задачи достигнуты, однако формулировка выводов носит чрезмерно широкий характер, что размывает восприятие собственных результатов автора. Такие формулировки трудно назвать удачными, они не подчеркивают реальных достижений исследований и его новизны.

По теме диссертации автором опубликовано 3 статьи в рецензируемых реферируемых научных изданиях, имеющих высокие показатели в рейтингах научных изданий. Работа прошла апробацию на четырех научных конференциях различного уровня.

Диссертация Матиева Антона Богдановича на тему: «Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с α -синуклеином» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Матиев Антон Богданович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета
д.б.н., доцент, профессор кафедры
анатомии и физиологии человека и
животных РГПУ им. А.И.Герцена

Алсу Фаритовна Сайфитдинова

РГПУ им. А.И. ГЕРЦЕНА

подпись *Сайфитдинова*
Алсу Фаритовны

удостоверяю « 10 » АВГ 2021

Отдел кадров управления по работе с кадрами
и организационно-контрольному обеспечению



Ветеринарный специалист по кадрам
Отдел кадров

Н.В. Курзакова